

## Saccharomyces cerevisiae 死細胞のオートリシス過程における タンパク合成に関する予備試験

佐藤優行・藤井孝典・白神泰義・土屋尚司

### PRELIMINARY EXPERIMENTS ON PROTEIN SYNTHESIS DURING AUTOLYSIS OF EXTINGUISHED CELLS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Masayuki SATO, Takanori FUJII, Yasuyoshi SHIRAGA, and Naoshi TUTIYA

Proteinase activity in extinct cells of *S. cerevisiae* increased during the incubation in MacIlvaine buffer (pH 5.0) at 30°C. We tried to demonstrate biosynthesis of proteins during this cell incubation. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine and  $^{35}\text{S}$ -methionine into the extinct cells increased with the incubation time and maximized after 96 hr.  $^{35}\text{S}$ -Methionine in polyacrylamide gel appeared apparently in one protein of  $m_w$  about 55,000 and weakly in some other proteins when the extinct cells were incubated for 96 or 144 hr. These results in the incorporation tests of label amino acids appeared to support our expect that lytic enzyme proteins are synthesized in the autolytic phase yeast cells. But these were not enough to demonstrate the expect. Further investigations are necessary to do so.

*S. cerevisiae*の熱処理死菌体を30°Cで緩衝液中 (pH 5.0) に振盪保持した時、自己解体が誘発され、この過程で各菌体内プロテアーゼ活性が増大した。それがシクロヘキシミド添加によりある程度抑えられた。そこでこの活性増大の一要因として酵素の新たな合成を仮定した。それを実証する目的でこの過程の各菌体に $^{14}\text{C}$ -ロイシンあるいは $^{35}\text{S}$ -メチオニンを60分間づつ取込ませたところ、菌体内タンパク区分へ両アミノ酸とも取込まれ、その放射能は保持時間と共に増大し、96時間後の菌体で最大となった。取込み後の菌体抽出液をSDSポリアクリルアミド電気泳動した後、フルオログラフィーにより放射能を検出したところ、分子量約55,000に相当するバンドを含め比較的少数のバンドが検出された。これらのことから本酵母の死細胞は自己解体過程で、ある特定のタンパク質をあらたに合成する可能性が示唆された。しかしまだ十分な裏付けが得られていないので結論を主張するに至っていない。

### 結 言

酵母のオートリシス過程におけるタンパク質の崩壊とプロテアーゼとに関しては、多くの研究報告がある<sup>(1-5)</sup>。それによると、エンド型のプロテアーゼAおよびBとエキソ型のプロテアーゼCが順次それぞれのインヒビターの離脱により活性化され、その結果細胞内のタンパク質が段階的に解体されていく、とされている。しかしその崩壊過程でプロテアーゼを含むタンパク質が合成されるかどうかについての検討はほとんど見当らない。一方、*Streptococcus faecalis*<sup>(6)</sup>、*Bacillus subtilis*<sup>(7)</sup>、*Neurospora crassa*<sup>(8)</sup>らの細胞では、オートリシス過程で細胞分解酵素を含むタンパク質が合成されることがアイソトープを用いた実験で示されている。

大橋ら<sup>(9)</sup>は「プログラムされた自己解体モデル」という独自の仮説を提唱した。これによると、細胞には死んだ後自己の生体成分を解体する機構があらかじめプログラムされており、細胞はその自

自己解体によって環境の原状回復という目的に寄与している、と考えられている。我々はこの仮説を実証する目的で一連の研究を行ってきた。そのうち酵母細胞に関するものでは、すでに *Saccharomyces cerevisiae* の加熱死細胞のオートリシス過程でプロテアーゼAおよびBの活性が増大すること<sup>(10)</sup>および同酵母の温度感受性変異株を非許容温度でインキュベートした時自己タンパク分解活性が増大すること<sup>(11)</sup>を報告した。大橋らの仮説に基づくと、こうしたプロテアーゼ活性が増大する機構の一つとして、前述の細菌細胞らの場合と同様に細胞の死後自己解体のために分解酵素が新たに合成されるという機構が考えられる。

そこで今回は、*S. cerevisiae* の死菌体をインキュベートする過程で菌体内タンパク質の合成が促進されるかどうかを実証することを目指して、アイソトープを使った予備試験を行なった。最終的には明確な結論を得るには至らなかったが、これらの実験結果を示すとともに、酵母における自己解体のメカニズムに関して考察した。

## 実験材料および方法

### 1. 使用菌株および培養法

本実験には財団法人発酵研究所から分譲を受けた *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0847 を使用した。培養はすでに報告した方法<sup>(12)</sup>に準じて行なった。すなわちグルコース40g、ポリペプトン3.5g、酵母エキス3.0g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0gをイオン交換水に溶かして1L (pH 5.5~6.0) としたものを培養液とし、通常27℃の下3日間回転振盪機上で培養した。

### 2. 菌体の熱処理およびオートリシスの誘発

前報<sup>(10)</sup>に準じた。すなわち遠心分離により集菌した後、菌体を0.1M MacIlvaine緩衝液 (pH 5.0) にて2回洗浄した。洗浄菌体を同緩衝液に懸濁 ( $10^9 \sim 10^{10}$  cells/ml) し、これを60℃で5分あるいは10分振盪しながら加熱した。この処理により細胞は99.9%以上死滅した。直ちに氷中で冷やした後、得られた死菌体を同緩衝液あるいはそれに各種物質を溶かした液に懸濁し (約  $10^9$  cells/ml)、30℃でゆっくり振盪しながらインキュベートした。

### 3. 菌体抽出液の調製

Yamamuraらの方法<sup>(13)</sup>に準じ、菌体を0.7Mソルビトール、0.1M 2-メルカプトエタノールを含む50mMリン酸塩緩衝液 (pH 7.5) 中で60分間Zymolyase処理によりプロトプラスト化した。同緩衝液で洗浄した後、洗浄プロトプラストを少量の0.1% TritonX-100液に懸濁し、これを氷冷下で超音波 (20kHz, 30秒, 6回) によりあるいは乳鉢中アルミナとともに破碎した。破碎懸濁液を遠心分離し、得られた上清液を菌体抽出液とした。

### 4. アミノ酸取込み活性の測定

Sayareらの方法<sup>(6)</sup>を一部改変して行なった。菌体への取込み活性を調べる場合は、菌体懸濁液 ( $10^8$  cells/ml, 0.1M MacIlvaine緩衝液, pH 5.0) 2mlに $^{14}\text{C}$ -ロイシン溶液 (L-[U- $^{14}\text{C}$ ]ロイシン0.3  $\mu\text{Ci/ml}$ , L-ロイシン60  $\mu\text{g/ml}$ , 同緩衝液) 1mlを添加し、30℃の下一定時間振盪保持した。この反応液から10分毎に0.5ml採取し、吸引濾過により菌体をガラス繊維濾紙上に集めた。冷水1mlずつで菌体を3回洗浄した後、菌体を濾紙ごと20ml容バイアルに入れた。これにトルエン系シンチレーター5mlを加えよく振盪した。その放射能を液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-1000) により測定した。バックグラウンドには冷水のみを濾過した濾紙を用いた。トルエン系シンチレーターは、トルエン: TritonX-100を2:1 (V/V) としたものを溶媒に、溶質としてDPO (6 g/L) およびPOPOP (0.05~0.1 g/L) を加えたものを用いた。菌体内タンパク質区分への取込みを調べる場合は、前述の場合と同様の組成で取込ませたが、量を10倍にスケールアップするとともに $^{35}\text{S}$ -メチオニン (15  $\mu\text{Ci/ml}$ ) をも用いた。菌体とラベルアミノ酸を60分間反応させ

た後、実験方法3に述べた方法で菌体抽出液を調製した。得られた抽出液に10%冷トリクロ酢酸(TCA)を等量加え、タンパク沈殿区分を得た。これをガラス繊維濾紙に取り、冷5%TCAで3回洗浄し、前述と同様に測定した。

#### 5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびフルオログラフィー

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmli<sup>(14)</sup>の方法に準じ、0.1%SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて行なった。タンパクの染色はCBBで常法どおり行なった。フルオログラフィーはLaskeyらの方法<sup>(15)</sup>に準じた。すなわち、泳動後のゲルを50%メタノール273mlと酢酸27mlとの混合液中で1時間振盪した後、増感剤(DUPONT)処理した。増感剤を除去した後、ゲルを乾燥し、X線フィルム(Hyperfilm- $\beta$  max, Amersham)を用いて前露光し、さらに-80°Cで10日間の露光を行なった。

#### 6. 分析

菌体内プロテアーゼ活性はKrauspeらの方法<sup>(16)</sup>を改変した既報の方法<sup>(11)</sup>に準じ、基質にアゾカゼインを用いて行なった。タンパク質およびその分解物の定量はLowryらの方法<sup>(17)</sup>により、標準に牛血アルブミンを用いて行なった。生菌数の測定はコロニー計数法による。全菌数は顕微鏡下、血球計算盤を用いて計数した。

#### 7. 試薬

牛血アルブミン、アゾカゼインはSigma Chemical Co.より、2-メルカプトエタノール、シクロヘキシミド、TritonX-100, DPO, POPOP, SDSは和光純薬工業<sup>(株)</sup>より、Zymolyase-20000は生化学工業<sup>(株)</sup>より、L-[U<sup>14</sup>C]ロイシンはICN Radiochemicalsより、L-[<sup>35</sup>S]メチオニンはDUPONTより、カザミノ酸はDifuco Laboratoriesよりそれぞれ購入した。

## 実験結果

### 1. 死菌体のオートリシス過程における菌体内プロテアーゼ活性の変動

既報<sup>(10)</sup>で、死菌体を30°Cの下緩衝液中でインキュベートすると、菌体はオートリシスを起こし、その過程で菌体内のプロテアーゼ活性が増大することを明らかにした。そこでこの緩衝液に各種物質を添加した場合、プロテアーゼ活性がどのように変動するか調べた。Fig.1にその結果を示した。緩衝液のみの場合に比べ0.2%になるようカザミノ酸を加えた時、明確に活性が増加した。カザミノ酸とシクロヘキシミドを加えた時、その約半分に低下した。ただし、緩衝液にシクロヘキシミドのみを加えた場合は、わずかな活性低下しか認められなかった。シクロヘキシミドの添加時期を種々変えて検討したが、その抑制効果をあまり明瞭に示すことはできなかった。1%グルコースを添加した場合、若干の活性増大効果を示した。一方、本菌の培養に用いた培地と同じ成分を加えた時、活性はほとんど増大しなかった。なお、本実験で菌体内プロテアーゼ活性が増大する場合は、菌体外へ溶出されるタンパク質あるいはその分解物の量も著しく増大し、その量は初期の菌体タンパクの70~80%に達した。

また別に、熱処理をしないで生きた菌体を緩衝液に懸濁し30°Cで保持した場合についても実験を行なった。その結果、生菌数( $10^9$  cells/ml)は18日目まではほとんど減少せず、その後減って24日目には約99%死滅した。一方菌体内プロテアーゼ活性はその間大きな変動がなく24日後の菌体では約70%に減少していた。すなわちこの場合は、死滅期に達するのに相当時間がかかるとともに、顕著な自己解体が観察できなかった。

### 2. <sup>14</sup>C-ロイシンおよび<sup>35</sup>S-メチオニンの菌体内タンパク質への取込み

前項の実験で死菌体内プロテアーゼ活性の増大が観察された。この活性増大要因の一つが酵素の新たな合成によるものかどうかを明らかにする手がかりとして、オートリシス中に死細胞内タンバ

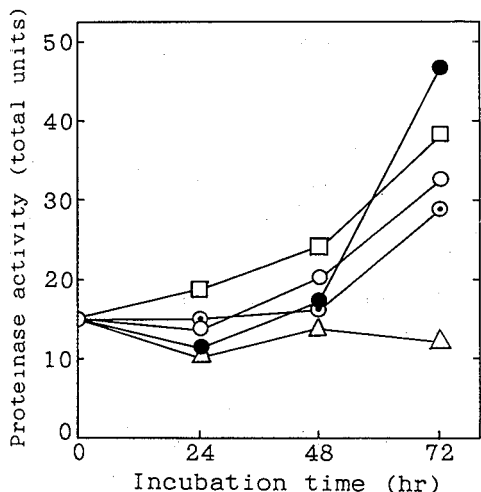


Fig 1 Intracellular Proteinase Activity during the Incubation of Extinct Cells

The extinct cells were incubated in MacIlvaine buffer (pH 5.0) (○), in the buffer containing 0.2% casamino acids (●), in the buffer containing 0.2% casamino acids and 100 μg/ml cycloheximide (⊙), in the buffer containing 1% glucose (□) and in the nutrient culture medium (△).

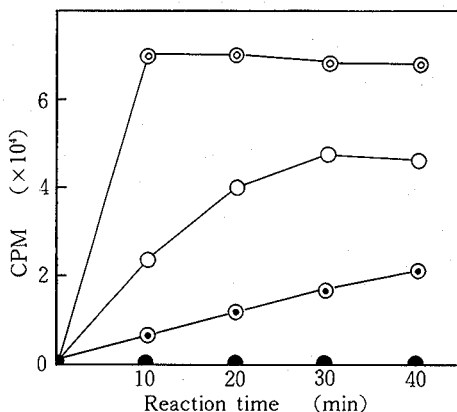


Fig 2 Radioactivity of <sup>14</sup>C-Leucine

Incorporated into the Cells Heated  
The cells were heated at 100°C for 5 min (●), at 60°C for 2 (○) or 5 (⊙) min and not heated (⊖).

ク質へのアミノ酸の取込みがあるかどうかを試験した。

まず加熱処理した菌体へ<sup>14</sup>C-ロイシンが取込まれるかどうかを調べた。Fig 2に示したように、無処理の生菌体は取込み活性が強く、ラベルしたロイシンは10分間で最大に達した。逆に100°C、5分加熱処理した完全死菌体ではほとんど取込みはなかった。60°Cの場合、2分間の処理では生きて細菌もかなり残っていると考えられ、30分間の反応で最大に達した。5分間処理では死滅率99.9%以上になったが、取込み能力はまだ残っており、反応時間40分間まではほぼ直線的に取込まれた。

そこで以後は60°C、5分間加熱処理した死菌体を用い、ラベルしたロイシンと20分反応させた時の放射能の取込みを1分当りに換算して、それを取込み活性とすることにした。Fig 3はこの死菌体を30°Cで緩衝液中に振盪保持した時、時間経過とともに取込み活性がどう変動するかを示した。48時間を経る頃から活性は上昇し、96時間後の菌体で最大に達した。その後は減少した。すなわち死細胞の自己解体が進むにしたがって、ロイシンの取込み活性が増大した。

この取込まれたロイシンが確かに菌体内のタンパク質へ入っているかどうかを知るために、各時間保持した菌体を60分間づつ<sup>14</sup>C-ロイシンと反応させた後、菌体内タンパク区分を抽出し、その放射能を測定した。同様の実験を<sup>35</sup>S-メチオニンを取込ませた場合についても行った。その結果をFig 4にまとめた。時間経過とともに放射能の取込みは増大し、96時間保持した時の菌体で最大に達した。そのタンパク区分取込み量の菌体内取込み量に対する比率はロイシンの場合約40%、メチオニンの場合約60%であった。

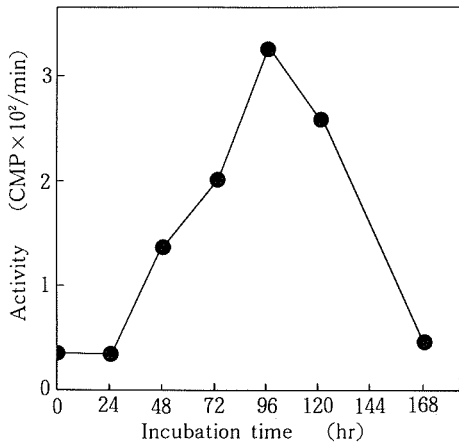


Fig. 3. Incorporation Activity of <sup>14</sup>C-Leucine into the Extinct Cells Incubated at 30°C, pH 5.0.

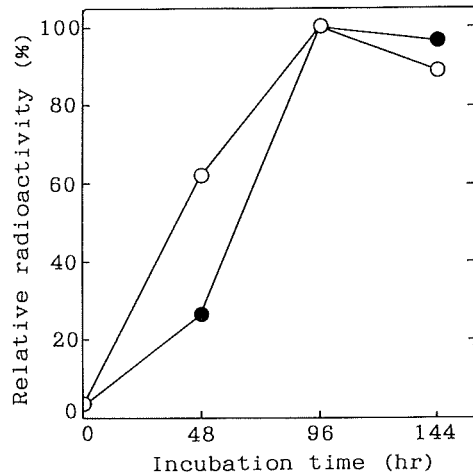


Fig. 4. Radioactivity of Labeled Amino Acids Incorporated into Intracellular Proteins in Extinct Cells.

The extinct cells incubated in MacIlvaine buffer (pH 5.0) at 30°C were mixed with L-<sup>14</sup>C-leucine (○) or L-<sup>35</sup>S-methionine (●) for 60 min.

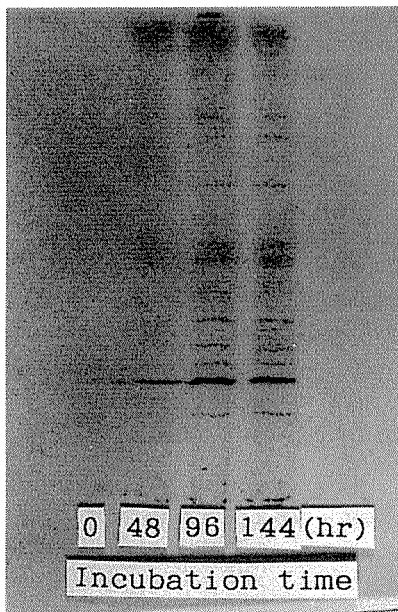


Fig. 5. Fluorography of Intracellular Proteins Incorporating L-<sup>35</sup>S-Methionine on SDS-Polyacrylamide Gel.

The extinct cells incubated in MacIlvaine buffer (pH 5.0) at 30°C were mixed with the isotope for 60 min.

### 3. 菌体内タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびフルオログラフィー

死細胞のインキュベーション中に菌体内タンパク質がどう変化するかを調べるために、各時間保持した後の菌体内タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。各試料にはほぼ同量のタンパクを含むようにした。その結果、インキュベーション前の菌体と48~144時間後の菌体とではほぼ同じ泳動パターンを示し、タンパクバンドの数は約80あった。一方、各菌体を<sup>35</sup>S-メチオニンと60分間反応させた後、泳動し、放射能の取込みバンドをフルオログラフィーで調べた。その結果をFig.5に示した。分子量約55,000に相当する位置に明瞭な取込みのバンドが現われ、その他マイナーなバンドが数本現れた。菌体内に存在するタンパク質と合成されるタンパク質とは

明らかに異なるパターンを示した。

#### 4. 死菌体のインキュベーション中に増加する生細胞数

熱処理によって死滅率99.9%以上になった死菌体を実験に用いてきたが、生きた細胞がわずかに残っている。前項までの実験ではその残存生細胞による影響を無視してきた。しかし、死菌体のインキュベーション中に自己分解により溶出してくる物質を栄養源にして残存生細胞が増殖していることが予想される。そこで、その過程で生細胞が増加するかどうかをコロニー計数法と顕微鏡による全菌数測定法とで調べた。その結果、緩衝液だけでインキュベーションした時、生菌数は48時間以後に増加が見られ、96時間後には全菌数の約7%に達した。緩衝液にシクロヘキシミドを添加した場合は生菌数の増加はほとんど認められなかった。

## 考 察

### 1 酵母自己解体過程におけるプロテアーゼの活性化機構について

酵母の自己解体では、細菌と異なり細胞壁多糖が残る、内部が先に解体され細胞外へ溶出されて空洞化していく。この時間与する中心的な解体酵素がプロテアーゼである。酵母プロテアーゼの主なものにはエンド型およびエキソ型の4種類が知られている<sup>(18)</sup>。細胞が正常な時、これらの酵素は細胞質中ではそれぞれに特異的なインヒビター(タンパク質)と結合して不活性化されている<sup>(19)</sup>。液胞中にある時はインヒビターが分解され活性化状態であると考えられるが液胞膜により細胞質タンパクとは遮られている<sup>(20)</sup>。細胞が致命的な状況に直面すると、細胞質中のインヒビターの一部がはずれ、ある酵素活性が発現するものと予想される<sup>(3,21)</sup>。その酵素が他のインヒビターを分解する。その結果各種のプロテアーゼがつぎつぎと連鎖反应的に活性化されていくと考えられている<sup>(19)</sup>。また液胞膜の破裂により活性酵素が細胞内に広がる。こうしたプロテアーゼの活性化はいわば、正常に制御されていた酵素活性が細胞内秩序の崩壊によって脱制御され、その結果によるものといえる。

一方、大橋ら<sup>(9)</sup>の仮説では、自己解体は生命活動の大事な一つとして細胞にあらかじめプログラムされたものと捉えられている。したがって、単に前述の脱制御によるだけでなく、同時にもっと積極的な(遺伝子による制御、解体酵素の生合成などを含む)機構が関与している可能性が考えられている。彼らはその一例として、テトラヒメナの細胞を用いて、その死滅期にリソゾームの酸性ホスファターゼが合成される可能性を示した<sup>(22)</sup>。著者らもその考えに賛同する立場をとった。酵母細胞の場合も致命的障害を受け増殖不能になった時自己解体のためにあらたにプロテアーゼを合成し、その結果活性が増大するのではないか、インヒビターの離脱によるのとは別に、そうした機構があるのではないかと考えた。従来の研究にはそのような機構を想定してそれを実証しようとしたものは見当たらない。

本実験では熱処理により得たコロニー形成能を示さない死菌体で自己解体を誘発させた。これは自己増殖代謝系を抑えて、自己解体系をより鮮明に浮かび上がらせたいと考えたからである。したがってこれらの死菌体にはまだプロテアーゼ活性をはじめ種々な代謝活性は残っている。しかもこれらをインキュベーションした時Fig 1のように時間の経過とともにプロテアーゼ活性の増大が観察された。この時カザミノ酸やグルコース添加によってその増大が若干促進された。しかもシクロヘキシミドによって若干抑制された。これらは活性増大にアミノ酸やエネルギー源を必要とする酵素の合成がおこなわれているのではないかと予感させる。また、シクロヘキシミドによって活性増大を顕著に抑えることができなかったが、その理由として、この試薬が死菌体内へ入りにくいのためか、または酵素合成による活性増大が一部にすぎずインヒビター離脱による活性化の方が大きな部分を占めるためではないかと予想される。なお、培地成分を添加した場合活性増大が認められな

かったが、予備実験によるとその原因の一つは酵母エキス中のビタミン類にあるのかもしれない。

## 2. 酵母の自己解体過程におけるタンパク質の合成

前述のように自己解体過程でプロテアーゼが新たに合成されるという期待を持った。さらに前の報文<sup>(11)</sup>でも自己タンパク分解酵素の合成を示唆した。また緒言でも述べたように、バクテリアでは自己解体過程でタンパク質が合成されるという報告がある<sup>(6,7)</sup>。そこで今回まず自己解体過程の酵母菌体内でタンパク合成が起こっているかどうかを明らかにする目的で標識アミノ酸の取込み実験を行なった。まず60℃、5分間の加熱処理菌体には死滅率が高いにもかかわらず<sup>14</sup>C-ロイシンの取込み能力が残っていることを確認した (Fig.2)。さらにその取込み活性はこの菌体をインキュベーション後、48, 72, 96時間と時間を経るに従って増加した (Fig.3)。しかもその放射能は確かに菌体内のタンパク区分にも取込まれていた (Fig.4)。これらのことから、この過程でタンパク質の合成が起こっているように見えた。さらに<sup>35</sup>S-メチオニンを取込ませた菌体タンパクのフルオログラフィーによると、この過程で合成されるタンパク質は分子量約55,000に相当するものをはじめ限られたタンパク質だけではないかと示唆しているように見える (Fig.5)。現在これらの新たに合成されるタンパク質がプロテアーゼを含む分解酵素であろうことを示唆するデータはまだ得ていない。とはいえここまでの結果はわれわれの期待に沿ったものではあった。

しかし問題点は多々ある。まずシクロヘキシミドによってアミノ酸の取込みが抑えられるという証拠をまだ得ていない。まだ条件がつかめていない。このことがはっきりし、さらにクロラムフェニコールなどでは抑えられないことも明らかになれば、合成の裏付けになるとともに、酵母以外の汚染バクテリアによるのではないかという疑いもかなり晴れるであろう。今後これらの実験を積み重ねてより確かめていきたい。つぎにこの死菌体のインキュベーション中にわずかに残っている生細胞が増殖し、全体の約7%にも達していることである。これは無視できないことである。なんとかこの過程での細胞の増殖を抑える方法を工夫せねばならない。しかしもし生菌体のタンパク合成にともなう取込みが大きく反映していると仮定するなら、フルオログラフィのパターン (Fig.5) は生菌体自身のタンパク質をSDS電気泳動した時のパターンとよく似たものになるのではないかと予想される。しかしそうならなかったことからFig.5の結果はやはり死菌体での取込みを表しているのではないかと期待される。

また、最近ユビキチン関与のタンパク質分解経路が明らかになってきた<sup>(23)</sup>。酵母にもその存在が知られている<sup>(24)</sup>。これは細胞内キラー酵素や制御酵素の濃度調節、生合成エラーや合成後損傷による異常タンパク除去などの役割を持つといわれている。この経路はATP要求性で基質特異性の高い分解システムであり、ユビキチンという安定なポリペプチドが関与している。しかもこのユビキチンは一種の熱ショックタンパク質である。こうした経路が本実験のような自己解体系におけるタンパク分解にも働いているかどうかは大変興味ある問題だが、それについては現在全く不明である。一般に熱ショックタンパク質は加熱により一時的に合成されるタンパク質といわれている。本実験での自己解体酵素は熱処理後、48~96時間を経てから合成されると予測され、一般の熱ショックタンパク質とは異なるものと予想される。

以上のようにわれわれは、酵母死菌体が自己解体していく過程でプロテアーゼ活性が増大する機構の一つとして、新たなタンパク (解体酵素) の合成が起こることを想定し、その実証に挑んだ。表面的にはそれを支持する結果が一応得られたが、まだまだ問題は多く、なんらかの結論を主張するに至っていない。今後さらにつめの実験および合成されるタンパク質がプロテアーゼなどの解体酵素であることの証拠等を固めていく必要がある。本来ならこのような途中の段階で報告すべきでないかもしれないが、再出発をはかるにあたって、けじめをつける意味で今までの成果を予備試験としてまとめた。

## 引用文献

- (1) HAYASHI, R. Y. OKA, E. DOI and T. HATA : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 359 and 367 (1968).
- (2) HAYASHI, R. Y. MINAMI and T. HATA : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 621 (1972).
- (3) LENNEY J F : *J. Bacteriol.*, **122**, 1265 (1975).
- (4) SAHEKI, T. and H. HOLZER : *Biochim Biophys Acta*, **384**, 203 (1975).
- (5) 三輪治文, 滝波弘一 : 酵母研究における方法論, 200~206, 学会出版センター, (1982).
- (6) SAYARE, M., L. D. MOORE and G. D. SHOCKMAN : *J. Bacteriol.*, **112**, 337 (1972).
- (7) SVARACHORN, A., A. SHINMYO, T. TSUCHIDO and M. TAKANO : *J. Ferment Bioeng.*, **68**, 252 (1989).
- (8) REYES, F., R. LAHOZ and A. V. MORENO : *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 347 (1981).
- (9) OOHASHI, T., D. NAKATA, T. KIKUTA and K. MURAKAMI : *J. Jpn Assoc. Philo. Sci.*, **18**, 79 (1987).
- (10) SATO, M., H. MORIMOTO and T. OOHASHI : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2609 (1987).
- (11) SATO, M., S. UEMATU, H. SENOO and C. NARIMATU : *Tech Bull Agr Kagawa Univ.*, **41**, 85 (1989).
- (12) SATO, M. and Y. OHTA : *Tech Bull Agr Kagawa Univ.*, **37**, 11 (1985).
- (13) YAMAMURA, M., Y. TERANISHI, A. TANAKA and S. FUKUI : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 13 (1975).
- (14) LAEMMLI, U. K. : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- (15) LASKEY, R. A. and A. D. MILLS : *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335 (1975).
- (16) KRAUSPE, R. and A. SCHEER : *Anal. Biochem.*, **153**, 242 (1986).
- (17) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (18) 林 力丸, 秦 忠夫 : 酵母における適応と制御, 3~17, 学会出版センター, (1977).
- (19) 佐伯武頼 : 酵母における適応と制御, 19~36, 学会出版センター, (1977).
- (20) HOLZER, H. and T. SAHEKI : *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **1**, 115 (1979).
- (21) BETZ, H. and U. WEISER : *Eur. J. Biochem.*, **62**, 65 (1976).
- (22) 大橋 力, 中田大介, 菊田 隆 : 生化学, **55**, 667 (1983).
- (23) HERSHKO, A. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 15237 (1988).
- (24) BACHMAIR, A., D. FINLEY and A. VARSHAVSKY : *Science*, **234**, 179 (1986).

(1991年11月30日受理)